Aus der Medizinischen Klinik der Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. Martini.

Untersuchungen über ein Pneumokokkengift, welches bei der weißen Maus Purpura erzeugt.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn

Vorgelegt am 7. Januar 1938

von

Dr. phil. **J. M. Spitzer**
aus New York, U. S. A.

BONN 1938
Anton Brand, Bonn

Gedruckt
mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität Bonn.

Referent: Priv. Doz. Dr. H e y m e r
Korreferent: Prof. Dr. M a r t i n i

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meiner Frau!

Inhaltsübersicht

I. Einleitung

II. Herstellung der Purpurasubstanz

III. Allgemeine Charakterisierung der Purpurasubstanz

IV. Chemische Charakterisierung der Purpurasubstanz

V. Immunbiologische Prüfung der Purpurasubstanz

VI. Verhalten der nicht enteiweißten Substanz

VII. Zusammenfassung der Ergebnisse

VIII. Literaturverzeichnis

I. Einleitung

Die ersten Untersuchungen auf experimentellen Wege Purpura mit pneumokokken Fxtrakten zu erzeugen wurden im Jahre 1907 von J. Heyrovsky an Mäusen durchgeführt. Er züchtete Pneumokokken in einer Bouillon, die als Zusatz 1% Glukose enthielt. Nach Entnahme der Kultur aus dem Brutschrank ließ er dieselbe eine Zeitlang zwecks Autolyse stehen, filtrierte die Pneumokokken ab und injizierte die überstehende Flüssigkeit. Er führte den Nachweis, daß so die Möglichkeit besteht Purpura bei Mäusen zu erzeugen, schränkte dies jedoch dahingehend ein, daß dies nur mit virulenten Kokken möglich sei. Wurde die zu injizierende Flüssigkeit 8 Tage alten virulent gewesenen Kulturen entnommen, so trat keine Purpura mehr auf. Spätere Untersucher hingegen, widerlegten dies einwandfrei, indem sie nachwiesen, daß auch aus avirulenten Kokken eine wirksame Purpura-erzeugende Substanz zu bereiten ist. 17 Jahre später, im Rahmen einer ausgedehnten Untersuchung über Oxydation und Reduktion bei Pneumokokken von Avery und Neill, wies letzterer nach, daß Extrakte von Pneumokokken hämorrhagische Purpura erzeugen. 1926 erschienen 2 Arbeiten von Julianelle und Riemann, denen eine weitere 1927 folgte, die eingehend sich mit der möglichst reinen Darstellung und chemischen sowie biologischen Charakterisierung befaßte. Diese Arbeiten erbrachten weitere grundlegende Tatsachen, nämlich, daß im Gegensatz zu Heyrovsky, mit avirulenten Pneumokokken Purpura zu erzeugen war, weiterhin, daß diese Substanz hitzebeständig ist, sich gegen Oxydationsmittel beständig erweist und daß die Purpura allen 4 Typen von Pneumokokken eigen ist. Neben dieser Reihe positiver Ergebnisse stellen die Untersucher eine Behauptung auf, die Mair (1928) berichtigt. Da die vorhin genannten Untersucher unter Benutzung von Pneu-

mokokkenkulturen bei denen die Autolyse unter Anwendung von Galle beschleunigt war, keine Purpura erzeugende Substanz darstellen konnten, nahmen sie an, daß das Purpura hervorrufende Prinzip aller Wahrscheinlichkeit nach ein sekundär auftretendes Abbauprodukt ist, welches im Verlauf der Autolyse entsteht. W. Mair gelingt eine Darstellung von Purpurasubstanz durch Auflösung mit Galle und Gallensalzen, wonach die Ausführungen von Julianelle und Riemann in Frage gestellt werden. Es wurden jetzt Untersuchungen durchgeführt, die zu einer genaueren biologischen und chemischen Charakterisierung der Purpurasubstanz führen sollten. Weiterhin sollte eine experimentelle Bearbeitung der Purpurasubstanz in immunbiologischer Hinsicht vorgenommen werden.

II. Herstellung der Purpurasubstanz

Um genügende Mengen Purpurasubstanz zu gewinnen, wurden Pneumokokkenkulturen in gleichzeitig sechs Gefäßen von je $^1/_2$ l Inhalt angesetzt. Nach Literaturangaben von Avery u. a. wurde zur Kultur eine Bouillon von Ph 7,8 gewählt da hierin das Wachstum optimal sein soll. Es wurden jeweils Pneumokokken von dem Stamm überimpft, dessen Purpurasubstanz zu unseren Untersuchungen gewünscht wurde. Vom Robert Koch Institut in Berlin wurden Pneumokokken des Typus I. II. und III. bezogen. Um eine hohe Virulenz zu erhalten, wurden Mäuse durch intraperitoneale Einspritzungen mit den verschiedenen Stämmen infiziert. Nach annähernd 12—24 Stunden gingen die Tiere unter Erscheinungen einer allgemeinen Pneumokokkensepsis ein. Sodann wurde Peritonealexsudat entnommen und mit dem entsprechenden Kaninchenserum (Behring) zur Sicherung der Indentität des vorher gespritzten Pneumokokkentypus ein Agglutinationsversuch unternommen. Nach der Feststellung, daß das Tier tatsächlich an einer durch den gewünschten Stamm hervorgerufen Sepsis eingegangen war, wurde Herzblut auf die erwähnten 3 l Bouillon übergeimpft. Die Kulturen wurden

dann 21 Stunden im Brutschrank (37 Grad) gehalten. An der entstandenen Trübung ließ sich ein ausreichendes Wachstum von Pneumokokken festellen. Die gesamte Flüssigkeit (3 l) wurde nach Prüfung auf Kulturreinheit in kleinen Portionen bei 5000 Touren je $^1/_4$ Stunde zentrifugiert. Der sich absetzende weiße Niederschlag wurde quantitativ gesammelt, in physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und wieder abzentrifugiert. Der gesamte Niederschlag wurde dann in 10 ccm physiologischer NaCl-Lösung aufgenommen, mit 2 ccm 10% Na-taurocholicum versetzt und 12 Stunden bei 37 Grad im Brutschrank belassen, um die Pneumokokken in dieser Flüßigkeit aufzulösen. W. Mair benutzte bei seinen Versuchen anstelle von taurocholicum Na-desoxycholicum und gibt an, daß unter Benutzung dieser Methode eine wirksamere Purpurasubstanz zu gewinnen sei. (In dieser Hinsicht werden demnächst vergleichende Untersuchungen angestellt, die diese Fragen klären werden.) Obwohl nach dem 12 stündigen Belassen im Brutschrank die Lösung nicht vollkommen klar ist, ist die Autolyse der Pneumokokken vollständig, da keine Bakterienleiber mehr festzustellen sind. Nachdem ein Teil der Flüßigkeit zu anderen Versuchen abgetrennt ist, wurde dieselbe dann mit 3 ccm einer 3% Essigsäure enteiweißt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und die überstehende Lösung nach Prüfung auf ihre vollständige Enteiweißung mit der nötigen Menge ca. 11 ccm $^1/_{10}$ n NaOH neutralisiert. Nach längerem Stehen tritt ein flockiger weißer Niederschlag auf, der nach Trennung von der überstehenden Flüßigkeit genau wie diese Purpura hervorrutt. Julianelle und Riemann haben eine weitere Reinigung vorgenommen, indem sie wie ich mit Essigsäure enteiweißten dann abzentrifugierten und die überstehender Flüßigkeit mit n Na OH neutralisierten. Dies wurde dann zunächst zur Hälfte mit $(NH_4)_2SO_4$ gesättigt und der dabei auftretende Niederschlag durch Zentrifugieren entfernt. Dann wurde eine vollkommene Sättigung mit $(NH_4)_2SO_4$ vorgenommen. Nur der hierbei sich bildende Niederschlag enthielt die Purpurasubstanz, die durch

Dialyse von Salzen befreit wurde. Unsere Methode weicht von der später in der Literatur gefundenen insofern ab als vor der Enteiweißung mit Essigsäure eine beschleunigte Autolyse mit Gallensalzen durchgeführt worden war. Es wurde von mir nicht als nötig erachtet mit Hilfe von $(NH_4)_2SO_4$ eine weitere Reinigung der Purpurasubstanz durchzuführen, da eine Prüfung ergab, daß die nicht ausgesalzene Substanz in Bezug auf Empfindlichkeit der Mäuse sowie qualitative Verschiedenheiten bei der Erzeugung der Purpura verglichen mit der gereinigten Substanz keine Unterschiede zeigte.

J. Heyrevsky hat zuerst eine Herstellungsweise ohne Verwendung von Galle oder Gallensalzen beschrieben. Nach Mair findet eine reine Cytolyse statt und nicht wie Julianelle und Reimann glaubten, noch dazu eine fermentative autolytische Digestion. Wir haben eine Überprüfung dieser Angabe vorgenommen, indem wir 1 l Bouillon mit Pneumokokken (Typ I) 24 Stunden im Brutschrank bei 37 Grad belassen haben, sodann abzentrifugierten und den Niederschlag in 5 ccm physiol. NaCl-Lösung aufgenommen haben. Daraufhin wurde die Aufschwemmung 48 Stunden im Eisschrank gehalten und dann die überstehende Flüssigkeit als Purpurasubstanz verwendet. Es zeigte sich, daß hiermit tatsächlich eine Purpura zu erzielen war, wenn auch die Flüssigkeit nicht so große Wirksamkeit entfaltete, wie oben beschrieben. Es sei der Vollständigkeit halber erwähnt, daß selbstverständlich eine Injektion von reinem Na-taurocholicum keine Purpura erzeugte wie auch bei Tieren, die an Zwischenfällen starben, niemals Pneumokokken festgestellt wurden.

W. Mair (1928) stellte fest, daß nicht alle Mäuse sich als anfällig gegen Purpura erweisen und zeigte in Züchtungsversuchen, daß Nachkommen von Mäusen, die für die Purpura empfänglich waren, in größerem Prozentsatz anfällig sind als solche, die auf ihre Empfindlichkeit nicht geprüft waren. Nach unseren Untersuchungen ist festzustellen, daß purpuraunempfängliche Mäuse auch bei öfter wiederholter Injektion sowie

Anwendung größerer Dosen keine Purpura aufweisen. Es bestehen hier gewisse Vergleichsmöglichkeiten mit allergischen Krankheiten (Asthma, angio-neurotisches Oedem, Urticaria, usw.), zu deren Stützung ich im Verlauf der Arbeit noch weitere Gründe anführen möchte. Es konnte sich vielleicht um eines der verschiedenen allergischen Erytheme oder um eine allergische Purpura handeln, wenn auch nicht im Sinne von Schönlein und Henoch.

III. Allgemeine Charakterisierung der Purpurasubstanz.

Die Purpurasubstanzen der Typen I., II. und III. von Pneumokokken erwiesen sich in Vorversuchen gleichartig, indem sie annähernd denselben Grad von Purpura erzeugten. Hierdurch erwies es sich vorerst bei den weiteren Untersuchungen als zweckmäßig, sich darauf zu beschränken, nur Purpurasubstanz zu verwenden, die aus Pneumokokken des Typs I gewonnen wurde.

A. Zur Feststellung der zur Purpuraerzeugung notwendigen Mengen resp. ihrer Variationsbreite wurde eine Reihe von Mäusen mit Purpurasubstanz intraperitoneal gespritzt. Es erwiesen sich Mengen von 0,3 bis hinab zu 0,025 ccm in absteigender Linie als wirksam. Durch Aussalzen gereinigte Purpurasubstanz besaß naturgemäß eine niedrigere Wirksamkeitschwelle.

B. Zur Beurteilung der Purpura sind folgende Gesichtspunkte wesentlich:

1. Äußere Erscheinungsform:

Der Schwanz der Mäuse erwies sich als am meisten empfindlich, danach die Ohren, die leicht eine rote Färbung, die sich manchmal auf einige Stellen beschränkte, manchmal überall ineinander überging und auch zu Schwellungen führen konnte. Es sind dies die Erscheinungen eines hämorrhagischen Exanthems, das auf einer diffusen Kapillarblutung beruht. Bei stärkerer Wirkung verfielen die Ohren sogar einer Nekrose. Die an letzter Stelle auftretenden Erscheinungen sind Rötung der

Nasenspitze sowie der gesamten Haut der Pfoten. Hin und wieder geschieht es, daß nur ein Ohr die charakteristische Rötung aufweist, während das andere keine Spur einer Purpura zeigt. Es tritt nie eine sichtbare Purpurawirkung an den Ohren auf, ohne daß dieselbe sich gleichzeitig am Schwanz bemerkbar macht, während der umgekehrte Fall eine häufige Erscheinung darstellt. Außerdem trat manchmal an den Gegenden, an denen die Tiere angefaßt worden waren, sowie an den Injektionsstellen oder an sonst mechanisch gereizten Hautstellen Purpura auf, nie jedoch auf dicht behaarten Körperteilen.

2. Es sind Kapillarschädigungen zu vermuten, die sich an pathologischen-histologischen Bildern nachweisen lassen müßten unter Anwendung besonderer Fibrinfärbemethoden. Vorerst läßt sich sagen, daß in der Leber die Kupferschen Sternzellen stärker hervortreten als in histologischen Normalbild. In der Milz ist das Vorhandensein von Megakaryozyten zu erwähnen. Heyrevsky betont, daß außer den hauptsächlich subkutanen Blutungen, in der Haut entzündliche serös zellig sowie serös zellig fibrinöse Exsudate auftreten.

3. Das Blutbild wird im Laufe der Untersuchung im Rahmen einer Dissertationsarbeit von Frl. J. Hermkes verfolgt. Gleichzeitig mit der Arbeit, die sich mit der chemischen Charakterisierung der Purpura befaßt, veröffentlichten Reimann und Julianelle eine Untersuchung, die sich mit Veränderungen im Blutbild nach Injektionen von Purpurasubstanz beschäftigte und stellten fest, daß sofort nach der Injektion eine Verminderung der Thrombocyten einsetzt, die am stärksten 24 Stunden nach der Injektion zu sein scheint. Die Thrombocytenzahl sank bis unter 500000 per ccmm. Zwischen 4 — 9 Tage setzt eine Thrombocytenregeneration ein, ja esfindet sogar eine Überregeneration statt, die sich erst nach 2 Wochen wieder ausgleicht. Die Zahl der roten Blutkörperchen wird ebenfalls reduziert, die Geschwindikeit ihrer Vernichtung wie auch ihrer Regeneration ist jedoch im Vergleich zu den Veränderungen bei den Thrombocyten verlangsamt. Die Leukocyten werden wenig

beeinflußt. Hermkes stellt fest, daß zunächst eine vorübergehende Leukocytose auftritt, die wahrscheinlich einer Reizwirkung der Purpurasubstanz zuzuschreiben ist. Es ist von grundlegender Bedeutung für die Charakterisierung in der von mir experimentell erzeugten Purpura, das eine Vernichtung der Thrombocyten nicht stattfindet im Gegensatz zu den oben erwähnten amerikanischen Autoren. Wir sind gewöhnt bei der Purpura in wesentlichen zu unterscheiden zwischen einer thrombocytopenischen und einer Purpura, die keinerlei Verminderung der Thrombocyten zeigt. Die von Hermkes festgestellten Tatsachen sind einer weitere wichtige Stütze für unsere oben ausgesprochene Erwägung, daß es sich um eine allergische Purpura handeln könnte, da die echte hämorrhagische Purpura (idiopathisch oder sekundär) stets mit einer Thrombopenie verläuft.

C. Prüfung der Purpurasubstanz auf Thermostabilität Julianelle und Reimann haben sich mit der Frage der Thermostabilität der Purpura schon beschäftigt und machen die Beobachtung, daß die Substanz eine gewisse Thermostabilität besitzt. Mair glaubte das bei Injektion vorher erhitzter Substanz eine Verzögerung beim Auftreten der Purpura zu verzeichnen ist. Ich möchte demgegenüber erwähnen, daß die Purpura bei Injektion erhitzter Substanz nicht verzögert auftritt, sondern genau so schnell wie im Normalversuch, jedoch in geringerer Stärke. Eine Abhängigkeit von der Temperatur ist also insofern vorhanden als die Substanz, eine Zeitlang einer erhöhten Temperatur ausgesetzt, an Wirksamkeit einbüßt.

Die Versuche wurden derart angestellt, daß je drei Mäusen 0,3 ccm Purpurasubstanz intraperitoneal injiziert wurden. Die Prüfungssubstanzen wurden vorher jeweilig 15 Minuten bei 60 Grad erwärmt oder 5 Minuten bei 100 Grad über dem Wasserbad erhitzt, während die injizierte Substanz bei drei Mäusen überhaupt keiner Erhitzung unterworfen wurde. Es zeigte sich, daß die unerhitzte Substanz am stärksten ansprach, indem die damit injizierten Tiere eine sehr starke Purpura auf den Ohren und am

Schwanz zeigten. Die Mäuse, denen die bei 60 Grad erhitzte Substanz injiziert wurde, zeigten etwas schwächere als die eben beschriebener Erscheinungen, während von den Tieren, die mit vorher bis 100 Grad erhitzter Substanz gespritzt wurden, nur 2 auf den Ohren, jedoch alle 3 am Schwanz Purpurasymptome, außerdem in viel leichterer Form als die vorherigen, aufweisen.

D. Immunisierung und Sensibilisierung mit Purpurasubstanz.

Die Injektion von Purpurasubstanz selbst größerer Mengen intraperitoneal führt bei Mäusen nie zum Tode. Mäuse, die sich für Purpura einmal empfänglich erwiesen haben, werden auch bei wiederholter Injektion nicht immun, sondern bei ihnen tritt dem Mengen entsprechend die Purpura in unverminderter Stärke auf. Diejenigen Tiere, die, wie schon erwähnt, überhaupt unempfindlich sind, lassen sich durch einmaliges oder mehrfache Injektion nicht sensibilisieren; es besteht bei ihnen ein natürlicher Schutz gegen die Purpuraanfälligkeit. Die gegen Purpura anfälligen Mäuse scheinen eine angebore allergische Disposition zu besitzen.

Im Gegensatz zu künstlich zu erzeugenden haben wir beim Menschen auch eine Anzahl solcher klinischer Allergien, (Asthma, Heufieber, Ekzem, Urticaria, u. a.) die bei wenigen Individuen spontan auftreten und sich beim normalen Menschen nicht künstlich erzeugen lassen. Sie beruhen jedoch auf einem besonderen Antikörpermechanismus, der in vielen Fällen leicht nachgewiesen werden kann. Es wurde gezeigt, daß vererbbare Faktoren für die Pathogenese eine gewisse Bedeutung besitzen, daß aber die Grundbedingungen nicht erblich sind. Zur Erklärung des Mechanismus war bis jetzt die Hypothese des Kontaktreizes notwendig weil sie allein eine gewisse Übereinstimmung zeigt mit unseren bisherigen Kenntnissen. über Antikörpererzeugung, anderseits weil eine Fehlen eines Kontaktes nicht widerlegt werden kann. In unserem Falle ist jedoch die Möglichkeit eines Kontaktes fast auszuschließen, sodaß wir es hier anscheinend mit einer primär auftretenden oder angeborenen Disposition für Purpura zu tuen haben. Bei einzelnen

spontan auftretenden Fällen sprechen wir von Idiosynkrasie. Es ist nachzuweisen, daß es sich in vielen solcher Fälle um eine Allergie handelt, die auf dem Vorhandensein eines Überschusses von Hautsensibilisierungsprinzipien oder sonstiger humoraler Faktoren beruht.

Der Behauptung von Julianelle und Reimann, daß Kaninchen durch Purpurasubstanz eine Schädigung erfahren, können wir uns nicht anschließen, da wir monatelang einer ganzen Reihe von Kaninchen bis zu 10 ccm Purpurasubstanz jedesmal injizierten ohne daß die Tiere gesundheitliche Störungen oder Änderungen im Blutbild aufwiesen. In den Fällen wo in der Nähe der Vene durch Zufälle bei der Injektion eine Infiltration des Gewebes stattfand, fiel das infiltrierte Gewebe einer Nekrose anheim. Wenn nach intravenöser Injektion oedematoese Schwellungen am Ohr auftraten, so verschwanden dieselben innerhalb 24—48 Stunden ohne die Tiere in ihrem sichtbaren sonstigen Befinden zu beeinflussen.

IV. Chemische Charakterisierung der Purpurasubstanz.

Gundel zitiert in seiner Zusammenfassung, (Die Bakteriologie, Epidemiologie und spezifische Therapie die Pneumokokkeninfektionen des Menschen unter besonderer Berücksichtigung der Pneumonie), u. a. die Untersuchungen von Schiemann und Avery. Bei ihren Untersuchungen über eine aktive Immunisierung gegen Pneumonie mit Hilfe des Kohlehydrates der Kapselsubstanz stellen genannte Forscher das gelegentliche Auftreten von Purpura fest, wenn größere Dosen Kohlehydrat injiziert wurden. Da die Amerikaner dieses Kohlehydrat der Kapselsubstanz in weitgehend gereinigter Form dargestellt haben und auch hiermit in einzelnen Fällen Purpura erzeugten, wurde die Vermutung ausgesprochen daß die Purpura durch das Kohlehydrat erzeugt werden könne. Es ist von ausschlaggebender Bedeutung festzustellen ob das Purpura erzeugende Prinzip tatsächlich das Kohlehydrat ist oder ob es sich um einen in chemischer Hinsicht ganz anderen Körper handelt. Zuvor habe

ich schon darauf aufmerksam gemacht, daß die Annahme von Julianelle und Reimann, daß die Purpurasubstanz ein autolytisch entstandenes Abbauprodukt der Pneumokokken darstelle, an Wahrscheinlichkeit verliert, da es Mair und mir möglich war mit großer Wahrscheinlichkeit durch Galle und Gallensalze Endotoxine in Freiheit zu setzen. Wir machten dabei die Annahme, daß unter Anwendung dieser speziellen chemischen Methode in dieser Zeit und unter diesen Bedingungen ein autolytischer Abbau nicht stattfindet, sondern das unter Cytolyse ein sofortiges in Freiheitsetzen eines schon präformierten Endotoxins stattfindet. Es spricht noch ein weiterer wichtiger Grund gegen die Annahme, daß das Kohlehydrat den Purpura erzeugenden Faktor darstellt, nämlich derjenige, daß das Kohlehydrat als streng typenspezifisch nachgewiesen ist, während die Purpurasubstanz keinerlei typenspezifische sondern nur artspezifische Eigenschaften erkennen läßt. Weiterhin wurde versucht mit Hilfe einer Säurehydrolyse das Kohlehydrat, das bei anderer Herstellungsweise selbstverständlich noch vorhanden war, abzubauen und hierauf ein einfaches Monosaccharid nachzuweisen. Es wurde eine Hydrolyse in 1% HCL Lösung bei 60 Grad und 8 stündiger Dauer durchgeführt. Der Versuch ein Monosaccharid nachzuweisen fiel negativ aus. Es wurde daran gedacht, daß die Purpurasubstanz nach Neutralisieren in der restlichen Lösung noch erhalten geblieben wäre. Wäre dieser Beweis zu erbringen so wurde das genügen nachzuweisen, daß die Purpurasubstanz kein Kohlehydrat ist. Dieser Beweis war jedoch nicht möglich, und wir müßten trotz unserer vorheriger Erwägung annehmen, daß entweder Kohlehydrat und Purpurasubstanz gleich und durch die Hydrolyse zerstört worden sind, oder daß die Purpurasubstanz, trotzdem sie chemisch gesehen ein anderer Körper sein kann, auch durch den Säureeinfluß vernichtet worden ist.

Da auf diesem beschritten Wege eine Entscheidung nicht möglich war, müßten wir uns einer anderen Untersuchungsrichtung zuwenden. Die Ergebnisse von Julianelle und

Reimann, nämlich die Aussalzung mit gesättigter $(NH_4)_2SO_4$ weist anf ein Albumin oder Preteid hin. Diese Annahme wird verstärkt durch die Koagulation dieses fraglichen Stoffes durch Hitzeeinwirkung, durch Fällung mit Trichlor-essigsäure, Sulfosalicylsäure und Alkohol. Weiterhin gibt diese Substanz eine positive Biuretreaktion und wird durch Trypsin soweit abgebaut, daß die Purpuraerzeugendewirkung fortfällt. Dieses Ergebnis kann ich bestätigen und habe versucht nach der Trypsinverdauung irgendein Monosaccharid unter Zuhilfenahme weiterer üblicher chemische Methoden nachzuweisen. Wäre dies möglich gewesen, so hätte, da die reine Kohlenhydrat-Natur der Purpurasubstanz jetzt nach all den vorhergehenden Erörterungen auszuschließen ist, immer noch ein Glykoproteid vorliegen können.

V. Immunbiologische Prüfung der Purpurasubstanz.

Bei der Untersuchung dieser Frage dienten Mäuse als Versuchstiere, zur Serumgewinnung wurden auch Kaninchen herangezogen, die längere Zeit hindurch in gewissen Zwischenräumen mit Purpurasubstanz gespritzt worden waren. Bei jeder Versuchsserie wurde eine Anzahl von Kontroll-Tieren zum Vergleich herangezogen.

A. Ist Immunserum (Typ I) in der Lage, gegen Purpura zu schützen?

Eine Serie von Mäusen wurde teils subkutan, teils intraperitoneal mit wechselnden Mengen von Pneumokokkenpferdeserum behandelt. An dem folgendem Tag wurde dann Purpurasubstanz injiziert. Mit einer Ausnahme erwiesen sich alle Mäuse genau so anfällig gegen Purpura wie im Normalfall. Tabelle I gibt ein Beispiel dieser Versuche.

Tabelle I

Datum	Schützt Pneumokokkenpferdeserum gegen Purpura?
3. V.	Maus a. 0,5 cc Pf=serum (Typ I) intraperitoneal
	b. 0,5 cc „ „ subkutan
	c. 0,25 cc „ „ intraperitoneal
	d. 0,25 cc „ „ subkutan
	e. Kontrolle unbehandelt
4. V.	Maus a. 0,3 cc P=Subst. (Typ I) subkutan
	b. „ „ „ „
	c. „ „ „ „
	d. „ „ „ „
	e. „ „ „ „
5. V.	Maus a. Zeigte Purpura
	b. „ „
	c. „ „
	d. „ „
	e. „ „

B. Besteht ein aktiver Schutz gegen Purpurasubstanz?

Zur experimentellen Bearbeitung dieser Fragen wurden zunächst zwei Kulturröhrchen mit Pneumokokkenbouillonkultur gezüchtet. Die Abtötung geschah durch einstündiges Belassen in einem Wasserbad bei einer Temperatur von 56 Grad. Nach dem Zentrifugieren wurde die abgeschiedene Substanz in 1 ccm physiolog. NaCl=Lösung aufgenommen. Dann wurde eine Serie von 8 Mäusen mit der so gewonnen Pneumokokkenaufschwemmung behandelt. Dies wurde in Abständen von je 4 Tagen wiederholt, und zwar wurde je eine Hälfte der Versuchstiere intraperitoneal, die andere Hälfte subkuten mit 0,1 ccm injiziert. Die Versuche wurden über einen Monat ausgedehnt. Nach dieser einmonatlichen Vorbehandlung wurden dann 0,5 ccm Purpurasubstanz intraperitoneal injiziert. Eine aktive Immunisierung der Tiere war trotz der längere Zeit andauernden Vorbehandlung nicht eingetreten. Es zeigte sich, daß die Purpurasymptome in gleicher Stärke wie auch ohne Vorbehandlung in Erscheinung traten.

C. Bewahrt die Purpurasubstanz die Tiere vor der Wirkung virulenter Pneumokokken?

In analoger Weise zum vorigen Versuch wurden die Tiere einen Monat lang in Abständen von 3 bis 5 Tagen mit 0,1 ccm Purpurasubstanz (Typ I) intraperitoneal gespritzt. Nach Ablauf eines Monats wurde den Tieren 0,1 ccm virulenter Pneumokokken (Typ I) intraperitoneal injiziert, die aus einem Bouillonröhrchen nach 24 stündiger Kultur entnommen wurden. Es zeigte sich dann, daß vorbehandelte Mäuse wie auch unvorbehandelte nach Ablauf der gleichen Zeit an den Folgen der Pneumokokkeninjektion zu Grunde gingen.

D. Bestehen Möglichkeiten einer Bildung von Purpurasubstanz im Tierkörper?

Die Frage ist dahingehend zu verstehen, ob die Möglichkeit besteht, durch Spritzen der Komponenten, die bei der chemischen Isolisierung der Purpurasubstanz eine Rolle spielen, im Tierkörper Purpurasubstanz zu erzeugen. Es wurden abgetötete Pneumokokken und daran anschließend sofort Nataurocholicum gespritzt. Um die Bildung aequivalenter Mengen, wie sie in den Versuchen zur Purpuraerzeugung benutzt worden waren, voraussetzen zu dürfen, wurden — wie eine Umrechnung ergibt — für 10 Tiere 10 Kolben von je 30 ccm Inhalt mit Pnemokokken beimpfter Bouillon angesetzt. Diese wurden 24 Stunden im Brutschrank belassen, dann wie üblich abzentrifugiert, abgetötet und in 0,5 ccm physiolog. NaCl-Lösung aufgenommen. Die Tiere wurden gespritzt und sofort anschließend erhielt die Hälfte 0,1 ccm, die andere Hälfte 0,05 ccm einer 10%igen Na-taurocholicum-Lösung injiziert. Purpura trat jedoch bei keinem der Tiere auf. (Siehe Tabelle II)

Tabelle II

10 Pneumokokkenkulturen (Typ I) auf je 30 ccm Bouillon nach 24 h. zentrifugiert, bei 56 Grad abgetötet und in je 0,5 ccm NaCl aufgenommen.

24. V. Maus a. Pneumokokkenaufschwemmung intraperitoneal; 10 Min. danach 0,05 ccm 10%ige Na-taurocholicum intraperit.
b. Das Gleiche
c. „ „
d. „ „
24. V. Maus e. Pneumokokkenaufschwemmung intraperitoneal; 10 Min. danach 0,1 ccm 10%ige Na-taurocholicum intraperit.
f. Das Gleiche
g. „ „
h. „ „
i. Kontrolle: Pneumokokkenaufschwemmung intraperit.
j. Kontrolle: 0,1 ccm 10%ige Na-taurocholicum intraperit.

26. V. a. b. c. d. e. f. g. h. i. j. } Purpura trat nicht auf.

Bei Injektion einer hochkonzentrierten lebenden Pneumokokkenaufschwemmung und anschließende Injektion von Na-taurocholicum-Lösung, gingen die Tiere wie zu erwarten war, an einer Pneumokokkensepsis zugrunde.

E. Kann man Mäuse mit Hilfe von Kaninchen-Purpura-Serum gegen Purpura schützen?

Ein Kaninchen wurde 5 Wochen lang in Abständen von je 7 Tagen mit 4 ccm Purpurasubstanz intravenös gespritzt. Die Menge erreichte naturgemäß für ein Kaninchen nicht aus, um bei diesem Purpurasymptom in Erscheinung treten zu lassen. Nach Ablauf der 6. Woche wurde dem Tier unter tiefer Narkose 90 ccm Blut steril entnommen. Nach Absetzen des Serums

wurde es mit Phenol versetzt derart, daß das Serum 0,5 % Phenol enthielt. Eine Serie von Mäusen wurde mit 0,5 ccm Serum intraperitoneal injiziert, was zunächst eine Schockwirkung infolge des artfremden Eiweißes auslöste, die sich in starkem, 15 Minuten dauerndem Zittern äußerte. 4 Stunden darauf wurde Purpurasubstanz intraperitoneal gespritzt. Es war keine Immunisierung gegen Purpura festzustellen, da die Mäuse die Purpurasymptome in gleicher Stärke wie beim Normalversuch aufwiesen.

VI. Verhalten der nicht enteiweißten Substanz.

A. Schützt die unenteiweißte Substanz gegen Purpura?

Es sei daran erinnert, daß die Versuche bisher mit Purpurasubstanz durchgeführt wurden bei der eine Enteiweißung mit 3 %iger Essigsäure vorgenommen worden war. In den folgenden Versuchen wurde auf die Enteiweißung verzichtet. In mehreren Versuchsreihen wurden Mäuse mit 0,1 bis 0,2 ccm unenteiweißter Substanz einen Monat hindurch vorbehandelt. Nach einem Monat wurde ihnen intraperitoneal enteiweißte Purpurasubstanz in einer Menge von 0,5 ccm injiziert. Die Purpura trat in unveränderter Stärke auf, wie wenn eine Vorbehandlung überhaupt nicht vorgenommen wäre, wenigstens nachdem nach Wiederholung des Versuchs die Annahme gelten mußte, daß einige Mäuse der ersten Serie, die keine Purpura zeigten, überhaupt refraktär waren.

B. Ist die unenteiweißte Substanz in der Lage, gegen virulente Pneumokokken zu schützen?

In mehreren Serien wurde Mäusen zunächst wieder einen Monat lang in 4 tägigen Abständen unenteiweißte Substanz intraperitoneal gespritzt. Nach Ablauf dieser Vorbehandlung wurde ihnen 0,1 ccm einer 24 stündigen Pneumokokkenkultur intraperitoneal injiziert. Die Mäuse gingen nach 8 bis 12 Stunden an Pneumokokkensepsis ein.

VII. Zusammenfassung der Ergebnisse

Es wurde eine Darstellungsweise für Purpurasubstanz angegeben die auf Grundlage der dabei angewandten chemischen Methoden erlaubt, bei anfälligen Mäusen mit größter Sicherheit Purpura zu erzeugen. Wie auch schon Mair, arbeiteten wir zur Ausführung einer beschleunigten Cytolyse mit Galle und Gallensalzen und glaubten deshalb von der Purpurasubstanz annehmen zu dürfen, daß es sich um ein Endotoxin handelt, das die für Purpura charakteristischen Erscheinungen hervorruft. Da es mit den in der Literatur und von mir für den Zweck der Untersuchung modifizierten Methode möglich ist, immer wieder auf experimentellen Wege Purpura hervorzurufen, vermochte ich unterstützt durch die Blutbilduntersuchungen von Frl. Hermkes darauf hinzuweisen, daß es sich nicht um eine thrombopenische Purpura, wie Julianelle und Reimann annehmen, sondern vermutlich um eine „allergische Purpura" wenn auch nicht im Sinne von Henoch und Schönlein handelt. Die von uns erzeugte Purpura weist eine gewisse Ähnlichkeit auf mit einer von Willebrand und Jürgens (1933) beschriebenen „konstitutionellen Thrombopathie". Der Vererbungsmodus, das Krankheitsbild sowie teilweise auch der hämatologische Befund weisen gewisse Übereinstimmung auf.

In Bezug auf die Grenzen der Wirksamkeit der Purpurasubstanz, sowie auf die äußere Erscheinungsform, wie auch die pathologischen Veränderung im Blutbild wurde eine allgemeine Charakterisierung gegeben. Weiterhin wurde die Hitzebeständigkeit der Substanz geprüft und die Feststellung gemacht, daß eine Abhängigkeit insofern vorhanden ist als nicht wie bei Mair eine verspätet einsetzende Reaktion bei vorher erhitzten Substanz eintritt sondern eine Abnahme der Intensität in quantitativer Hinsicht bei den makrokopisch bemerkbaren Purpuraerscheinungen zu konstatieren ist.

Die Immunisierungs- und Sensibilisierungsversuche mit Purpurasubstanz zeitigten als wesentliches Ergebnis, daß Mäuse die eine Veranlagung für Purpura besitzen auch bei vielfacher

Injektion nicht zu immunisieren sind. Unempfindliche Tiere bleiben unempfindlich. Man kann dies als weitere Stütze für die Annahme einer allergischen Purpura auffassen.

Die chemische Arbeitsmethode für die Darstellung der Purpurssubstanz mit Galle und Gallensalzen, die zunächst von Mair angewandt wurde und die auch ich unter geringer Modifikation angewandt habe, läßt vermuten, daß in Gegensatz zu Julianelle und Reimann ein Endotoxin vorliegt. Die Immunisierungsversuche der Amerikaner mit gereinigter Kapselsubstanz ruft nur in wenigen Fällen Purpura hervor. Julianelle und Reimann machen an Hand ihrer chemischen Prüfung der gereinigten Purpurasubstanz wahrscheinlich, daß das wirksame Prinzip ein Albuminartiger oder zusammengesetzter Eiweißkörper ist. Dies möchte ich durchaus bestätigen, außerdem konnte ich nachweisen, daß es sich auch um kein Glykoproteid handelt, da kein Kohlenhydrat nachzuweisen ist.

Die Immunbiologischen Versuche sind nicht ganz abgeschlossen. Mäuse mit Purpurasubstanz gegen virulente Kokken zu immunisieren hatte negativen Erfolg. Wir waren uns darüber klar, daß unsere Purpurasubstanz auch das Kohlehydrat der Kapselsubstanz enthielt. Wäre eine Immunisierung möglich gewesen, so hatte dieselbe auch auf der Wirkung der Kapselsubstanz beruhen können. Roß (1930) fand bei seinen Versuchen, daß bei Fütterung von Ratten per os mit Berkefeldfiltraten von mit Na-glykocholat aufgelösten Kokken eine Immunisierung gegen Pneumokokken stattfindet. Die Purpurasubstanz konnte bei dieser Futterungsmethode überhaupt nicht zur Geltung gelangen, da sie durch Trypsin zerstört wird. Es besteht die Möglichkeit, daß bei unseren Versuchen die Puurpurasubstanz die immunisierende Wirkung des Kohlenhydrats aufhebt oder abschwächt, sodaß wir keine positiven Ergebnisse erhalten konnten.

Das Arbeiten mit enteiweißter Purpurasubstanz weist gegenüber demjenigen mit nichtenteiweißter Substanz keinerlei Vorteile auf.

Ich möchte darauf hinweisen, daß in der Literatur vereinzelte Fällen von Pneumonie bekannt geworden sind, wo beim Menschen kurz vor dem Tod Purpuraerscheinungen auftraten. Ob diese in ursächlichen Zusammenhang stehen mit der von uns experimentell erzeugten Purpura ist bis jetzt noch nicht zu entscheiden. Die Tatsache, daß die Erscheinungen in dem Moment auftreten, wo Pneumokokken in übergroßer Menge erzeugt und vernichtet werden, ließe auf eine vermehrte Bildung von Purpurasubstanz schließen.

Für die Anregung zu dieser Untersuchung sowie vielfache Ratschläge sage ich Herrn Oberarzt Dr. Heymer aufrichtigen Dank.

VIII. Literaturverzeichnis.

1. Heyrovsky, J., Wien. klin. Woch., 1907, XX. 247.
2. Avery, O. T. und Neill, J. M., J. Exp. Med, 1924. XXXIX. 347.
3. Julianelle, L. A., und Reimann, H. A. J. Exp. Med., 1926, XLIII. 87.
4. Julianelle, L. A., und Reimann, H. A. J. Exp. Med., 1926, XLIII. 97.
5. Julianelle, L. A., und Reimann, H. A., J. Exp. Med., 1927, XLV. 609.
6. Mair, W., J. Path. und Bact., 1928, XXXI. 215.
7. Gundel, M., Erg. Hyg., 1931, XII. 132.
8. Willebrand, E. A., von, und Jürgens, R., Arch. Klin. Med., 1933, CLXXV. 453.
9. Ross, V., J. Exp. Med., 1930, LI. 585.
10. Bazan, F., Semana med., 1921 XXVIII. 209.
11. Nobécourt, P., und Mathieu, R., Arch med. enf., 1920, XXIII, 689.

Lebenslauf.

Ich, Joseph M. Spitzer, Sohn von Maurice J. und Clara I. Spitzer wurde am 26. September 1908 in New York City geboren. Nach der Grammar School besuchte ich die De Witt Clinton High School in New York und 1927—1930 die University of Virginia in Charlottesville, Va. Von 1931 bis 1932 besuchte ich die Columbia University in New York. Seit Beginn des Wintersemesters 1932 studiere ich an der Universität Bonn Medizin und Naturwissenschaften. Bei der Medizinischen Fakultät bin ich seit dem Wintersemester 1932 und bei der Philosophischen Fakultät seit dem Wintersemester 1933 eingeschrieben. Im Februar 1935 bestand ich in Bonn die ärztliche Vorprüfung und die mündliche philosophische Doktorprüfung am 24. Juni 1936.